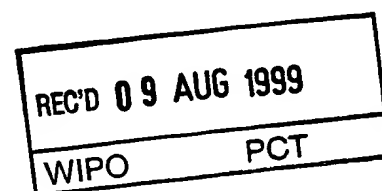


*GR* PCT/DE 99/01350  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND** 5

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Bescheinigung**

*DE 99 / 1350*

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts  
in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeich-  
nung

"Multivalente Antikörper-Konstrukte"

am 5. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.


München, den 23. Juni 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Ebert *[Signature]*

 Patentzeichen: 198 19 846.9

Anmelderin: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Unser Zeichen: K 2534 - hu / A

### Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei  $V_H$ - und zwei  $V_L$ -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer  $V_H$ - und einer  $V_L$ -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische

Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes,  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen  $F_v$ -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit

sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem  $NH_2$ -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz  $(G_4S)_4$ , aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher

bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His<sub>6</sub>: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His<sub>6</sub>: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /ac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -paare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz codiert, und einem Gen, das für das tetravalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem

*Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignals;  $V_H$ : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignals;  $V_H$ : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten in Bakterien**

Die Plasmide pHOG- $\alpha$ CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der  $V_H$ -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und mit dem mit *EcoRI/EcoRV* linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der  $V_L$ -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-



AGCACACAAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTT-TAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCACCACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCACCACCACAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Nco*I/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Nco*I/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

**Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Hefe**

**(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL**

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker,

Zeocin<sup>TM</sup>, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBn 5'-GGTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Eco*RI und *Xba*I gespalten und in mit *Eco*RI/*Xba*I linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

#### (B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit *Eco*RI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *Xba*I gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *Nco*I gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *Xba*I wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

#### Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

*E. coli*-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM

Glucose (2xYT<sub>GA</sub>) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT<sub>GA</sub> wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu<sup>2+</sup> beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluentens minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest

(1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte wurden aus den  $A_{280}$ -Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1,96$  bzw. 1,93 bestimmt.

**Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris***

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *SacI* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

**Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes**

**(A) Größenausschlußchromatographie**

Eine analytische Gelfiltration der  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter

Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200  $\mu$ l/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

#### (B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>-akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet.  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100  $\mu$ l der F<sub>v</sub>-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l 10  $\mu$ g/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

#### (C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME

supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstests bewertet;  $2 \times 10^6$  Zielzellen wurden mit  $200 \mu\text{Ci Na}^{51}\text{CrO}_4$  (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von  $2 \times 10^5/\text{ml}$  resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in  $100 \mu\text{l}$  wurden auf  $10^4$  Zielzellen/Vertiefung in  $50 \mu\text{l}$  titriert.  $50 \mu\text{l}$  Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.  $100 \mu\text{l}$  des Überstands wurden gewonnen und auf  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als:  $(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (-\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100$ .

K 2534

### Patentansprüche

- 5
1. Multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
  2. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 - 10 Aminosäuren aufweisen.
  - 10 3. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
  - 15 4. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
  5. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.
  - 20 6. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> aufweist.
  7. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
  - 25 8. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.
  9. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 30 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

10. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
11. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
19. Verwendung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.



K 2534

### **Zusammenfassung**

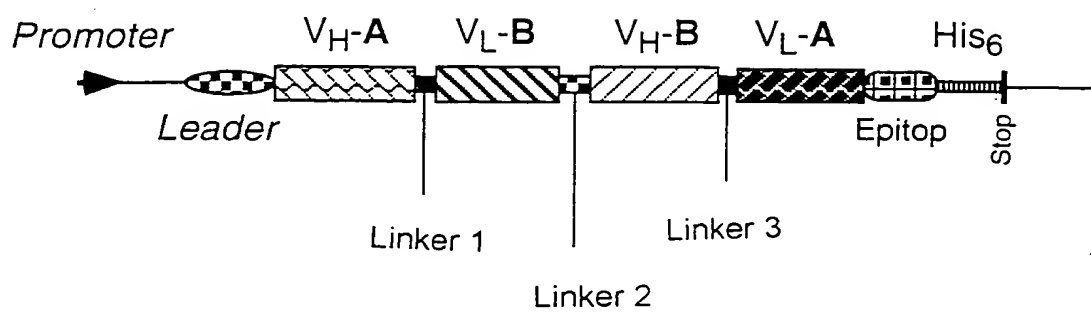
5

#### **Multivalente Antikörper-Konstrukte**

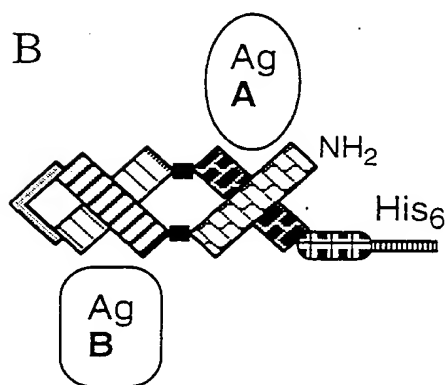
10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

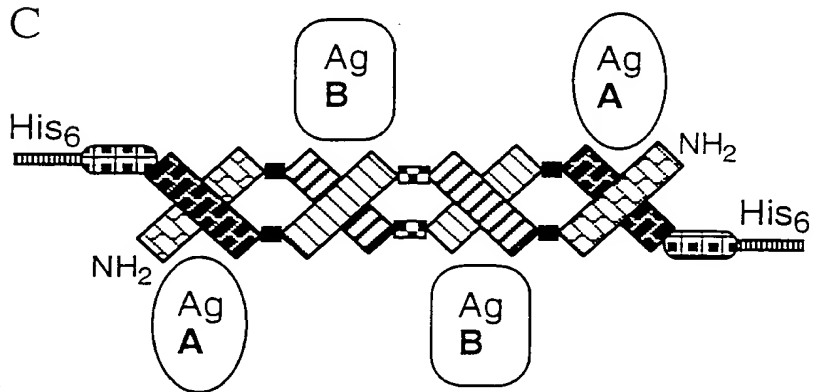
A



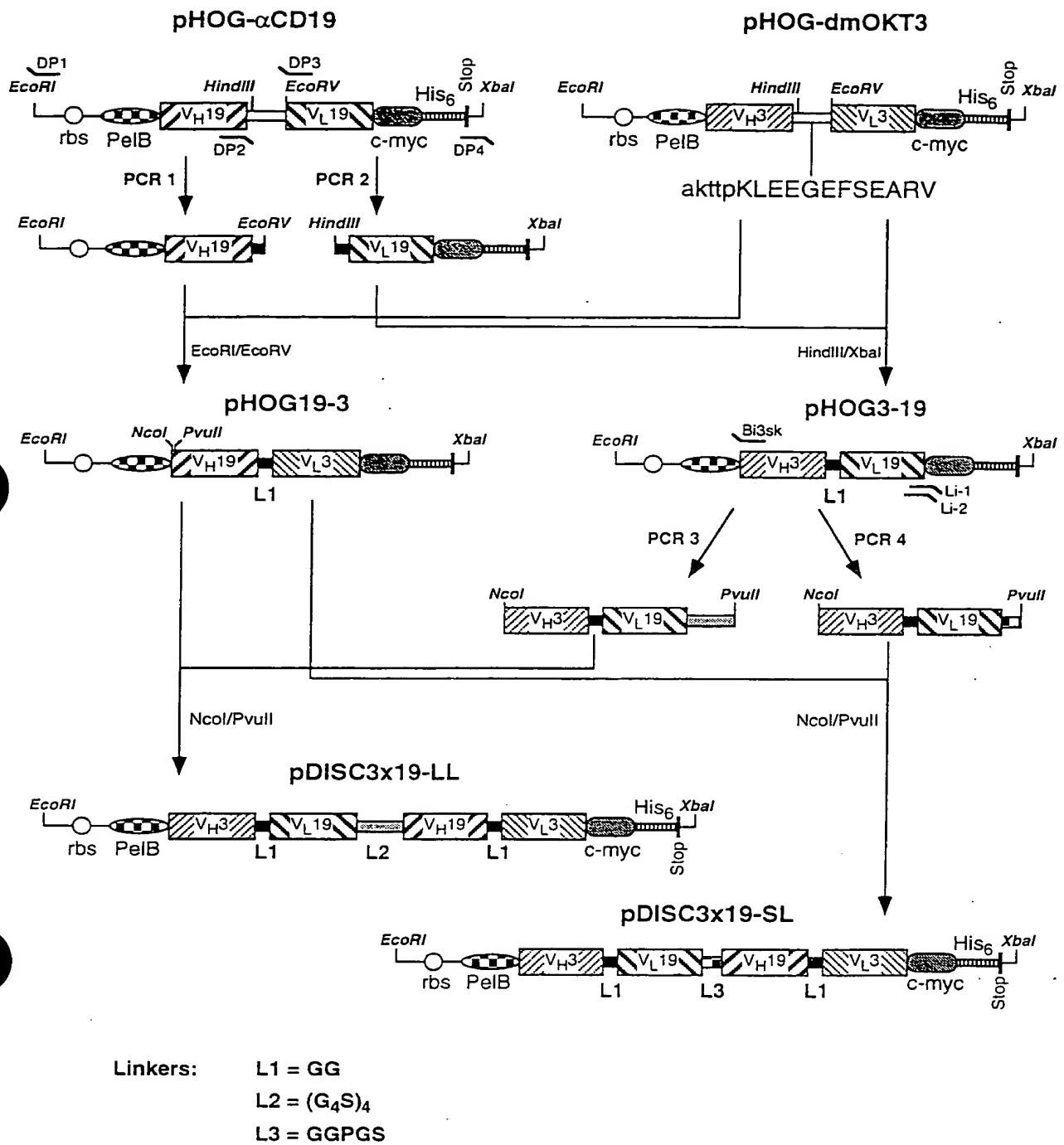
B



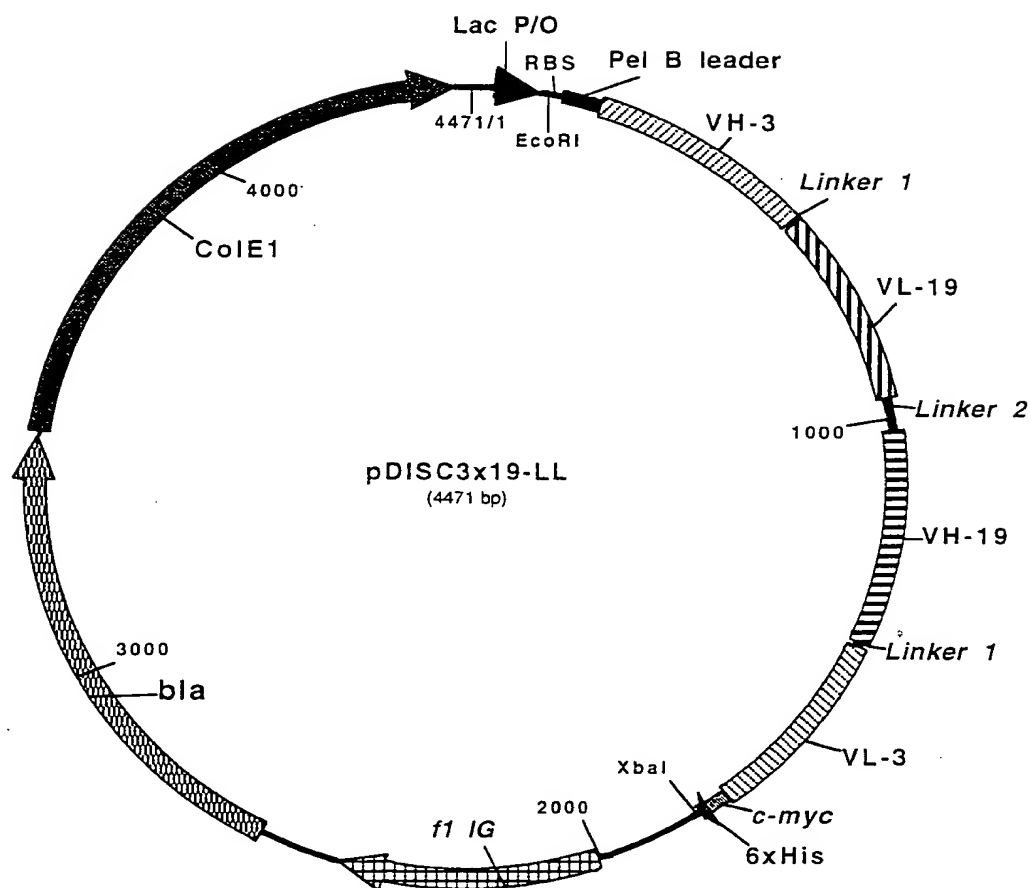
C



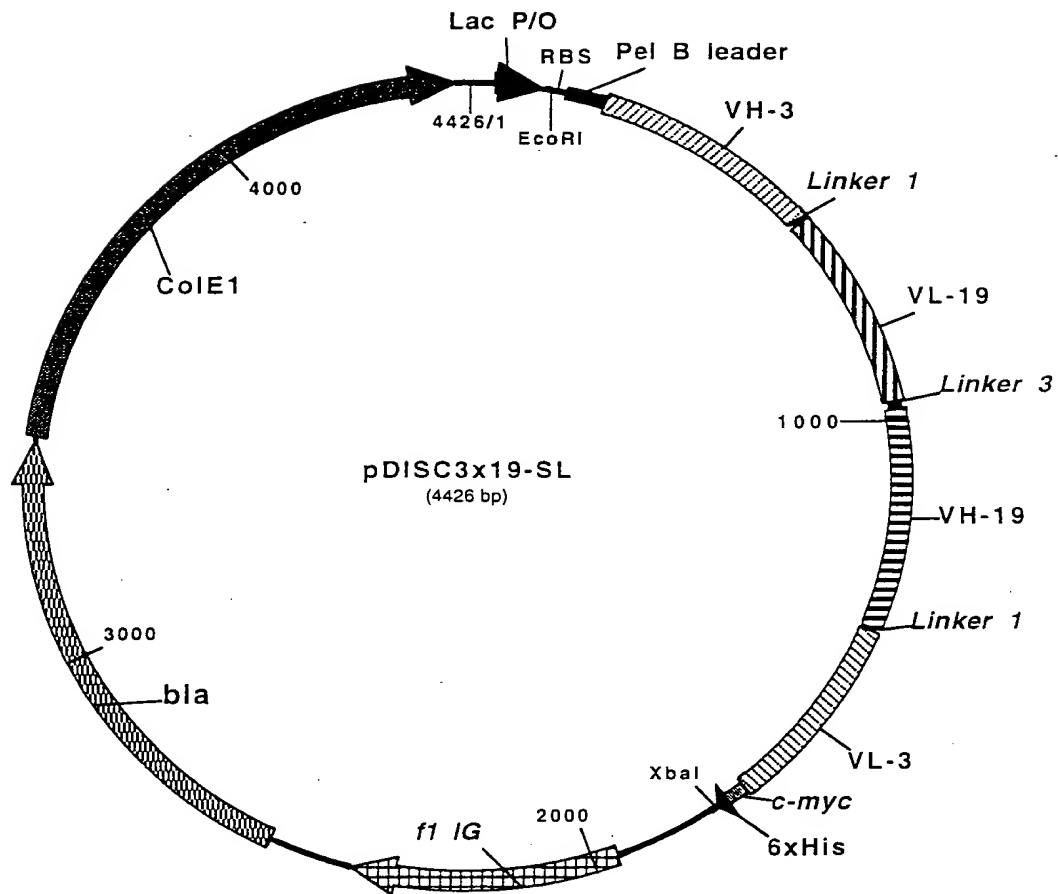
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI RBS PelB leader NcoI  
 1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG  
 1 M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M  
 \* Frame-H1 VH anti-CD3  
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC  
 22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 183 TAGGTACACGATGCACCTGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC  
 52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T  
 Frame-H3  
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC  
 80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T  
 CDR-H3 Frame-H4  
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACCTCTCA  
 109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L  
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19  
 440 CAGTCTCTCTCAGCCAAACACACCCAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCACAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGA  
 138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q  
 CDR-L1 Frame-L2  
 530 GGGCCACCATCTCTCTGCAAGGCCCAAAGTGTGTGATTATGATGGTGTAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC  
 168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G  
 CDR-L2 Frame-L3  
 614 AGCCACCCAACTCTCTATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
 196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G S G T D F  
 CDR-L3 Frame-L4  
 702 CACCTCAACATCCATCTCTGTGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCAGTGTGAGCAAAAGTACTGAGGATCCGTGGACSTTCCGTGGA  
 225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G  
 C kappa NotI Linker 2  
 790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAAGGGCTGATGCTGCGGCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGG  
 255 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G G S G G G G  
 PvuII Frame-H1 VH anti-CD19  
 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGAGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGG  
 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 962 CTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC  
 312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W  
 PstI Frame-H3  
 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCCTACA  
 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y  
 CDR-H3  
 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTAT  
 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y  
 Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1  
 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGTCTCACTC  
 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T  
 VL anti-CD3 CDR-L1  
 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGG  
 427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W  
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3  
 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA  
 456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G  
 CDR-L3  
 1481 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA  
 485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N  
 Frame-L4 C kappa c-myc epitope  
 1569 CCCATTACGTTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGCTGATACTGCACCAACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAG  
 514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S  
 His6 tail XbaI  
 1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA  
 543 E E D L N S H H H H H H

FIGUR 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI

1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGTCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG

1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC

22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGCCCTGGACAGGGCTCTGGAATGGATTGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC

52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

257 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC

80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCCACTCTCTCA

109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCCTCAGCCAAAACACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGTCTACCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA

138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGCTACCAACAGATTCCAGGAC

168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGA

225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAAAGGGCTGATGCTGGCGCCGCTGGTGGCCAGGGTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCT

255 G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTGATAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGC

284 V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGGCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC

314 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGAC

342 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA

372 R E T T T V G R Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCA

400 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAA

430 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGCTTCTGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC

458 L A S G V P A H F R G S G S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCAAGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTGGAAATAAACCGGGCTCATCTGC

488 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCAATCACCATCACCATCACTAATCTAGA

517 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H

FIGUR 6

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG  
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT  
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC  
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7



941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
 1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG  
 25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

89 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT  
 90▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG  
 75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
 99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8

**THIS PAGE IS BLANK**